

ISABELLA CHIARINI MATHIAZZI

**ESTUDO DA VARIABILIDADE GENOTÍPICA E
FENOTÍPICA DA *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* NAS
SECREÇÕES RESPIRATÓRIAS DE PACIENTES COM
FIBROSE CÍSTICA**

CAMPINAS

2007

ISABELLA CHIARINI MATHIAZZI

**ESTUDO DA VARIABILIDADE GENOTÍPICA E
FENOTÍPICA DA *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* NAS
SECREÇÕES RESPIRATÓRIAS DE PACIENTES COM
FIBROSE CÍSTICA**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para Obtenção do título de Mestre em Saúde da
Criança e Adolescente, área de concentração em Saúde da
Criança e Adolescente.*

ORIENTADOR: PROF. DR. ANTONIO FERNANDO RIBEIRO

CAMPINAS

2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

M431e Mathiazzi, Isabella Chiarini
Estudo da variabilidade genotípica e fenotípica da *Pseudomonas aeruginosa* nas secreções respiratórias de pacientes com fibrose cística / Isabella Chiarini Mathiazzi. Campinas, SP : [s.n.], 2007.

Orientador : Antonio Fernando Ribeiro
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Fibrose cística. 2. *Pseudomonas aeruginosa*. 3. Técnica de Amplificação ao Acaso de DNA Polimórfico. I. Ribeiro, Antonio Fernando. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : *Pseudomonas aeruginosa's and phenotypical variability study in respiratory secretions of patients with cystic fibrosis*

Keywords: • Cystic fibrosis
• *Pseudomonas aeruginosa*
• RADP

Titulação: Mestre em Saúde da Criança e do Adolescente
Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Banca examinadora:

Prof Dr Antonio Fernando Ribeiro
Profa. Dra. Vera Lúcia Gil da Silva Lopes
Prof Dr Leo Roberto Barth

Data da defesa: 31 - 08 - 2007

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof. Dr. Antonio Fernando Ribeiro

Membros:

1. Prof.(a). Dr(a). Antonio Fernando Ribeiro

2. Prof.(a). Dr(a). Vera Lúcia Gil da Silva Lopes

3. Prof.(a). Dr(a). Léo Roberto Barth

**Curso de Pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.**

Data: 2007

DEDICATÓRIA

À minha mãe - Maria Elisa Chiarini.

À minha mãe Maria Elisa Chiarini, que sempre me incentivou e sem medir esforços sempre esteve ao meu lado, apoiando, criticando, dando conselhos, acreditou em mim como ninguém, sem ela com certeza não existiria este trabalho.

Ao Profº. Drº. Antonio Fernando Ribeiro, orientador que com sua humildade e carinho conquista seus alunos, obrigada pela oportunidade de desenvolver este trabalho, pela orientação e confiança.

À Dra. Carmem Silvia Bertuzzo, por permitir que eu realizasse meu estudo no Laboratório de Genética Médica, pelos ensinamentos, ajuda, muita paciência e motivação.

Aos alunos do Laboratório de Genética Médica, principalmente a Cíntia Corrêa, Liliam Queiroz e Leonardo Arruda, pela grande ajuda prestada.

À Dr. Angélica Zaninelli Schreiber, por ter me acolhido no Laboratório de Microbiologia para que eu pudesse iniciar meu estudo.

À toda equipe do Laboratório de Microbiologia do HC/UNICAMP, a Marizete, Eliane, Luzia, por toda ajuda prestada e pela boa vontade de ensinar.

Aos colegas da Pós-graduação, pelos momentos de alegria, companheirismo, aos professores do curso de pós-graduação. À Simone do CIPED, a sua amizade com certeza fez toda diferença.

Aos pacientes do Ambulatório de Fibrose Cística do HC/UNICAMP e seus familiares, que permitiram e colaboram na realização deste trabalho.

*"Cada homem que eu encontro é melhor
do que eu em um ponto; e nesse particular
eu aprendo com ele"*

Abraham Lincon

	PÁG.
RESUMO	<i>xii</i>
ABSTRACT	<i>xiv</i>
INTRODUÇÃO	16
1- Epidemiologia	17
2- Fisiopatogenia	17
2.1- Função da CFTR.....	17
2.2- Classificação das mutações.....	19
2.3- Manifestações clínicas.....	20
2.4- Diagnóstico clínico e laboratorial.....	21
2.4.1- Critérios clínicos.....	21
2.4.2- Critérios laboratoriais.....	21
3- Doença pulmonar	22
4- O Microrganismo <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24
4.1- Fenótipos da <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25
4.2- Características genéticas da <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26
4.3- Identificação da <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28
JUSTIFICATIVA	30
OBJETIVOS	33
Objetivos gerais	34
Objetivos específicos	34

MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
1- Delineamento do estudo.....	36
2- Sujeitos.....	36
3- Critérios de inclusão.....	36
4- Critérios de exclusão.....	37
5- Microbiologia.....	37
5.1- Fenótipos da <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	37
5.2- Coleta do material.....	37
5.3- Isolamento das cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	37
6- Genotipagem.....	38
6.1- Genótipos da <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	38
6.2- Isolamento do DNA genômico das <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	38
6.3- Reações RAPD.....	38
7- Estatística.....	39
8- Comitê de ética.....	39
RESULTADOS.....	40
DISCUSSÃO.....	57
CONCLUSÕES.....	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
ANEXO.....	70
Anexo 1 Parecer do Comitê de Ètica em Pesquisa.....	71
APÊNDICE.....	72
Apêndice 1 Ficha para Coleta de Dados.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus centígrados
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µM	Micromolar
ASL	Líquido de superfície das vias aéreas
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator</i>
Cl⁻	Cloro
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetraacético
FC	Fibrose cística
HC	Hospital das Clínicas
IRT	Tripsina Imuno Reativa
Kb	Quilobase
mEq/l	Mol equivalente por litro
MgCl₂	Cloreto de magnésio
Mmol/l	Milimolar por litro
mM	Milimolar
Na⁺	Sódio
Nº	Número
pb	Pares de base
PCR	<i>Polimerase chain reaction</i>
PFGE	<i>Pulsed field gel eletrophoresis</i>
pH	Concentração hidrogeniônica
pmoles	Picomoles
P. aeruginosa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAM	<i>Pseudomonas aeruginosa mucóide</i>
PANM	<i>Pseudomonas aeruginosa não-mucóide</i>
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
RNA_m	Ácido ribonucléico mensageiro
S. aureus	<i>Staphylococcus aureus</i>
TBE	Tris-Ácido Bórico-EDTA

LISTA DE TABELAS

		PÁG.
Tabela 1-	Distribuição dos Fenótipos das <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	44
Tabela 2-	Análise comparativa entre os dois momentos.....	45
Tabela 3-	Apresentação dos fenótipos das <i>P. aeruginosa</i> na primeira coleta da secreção respiratória dos 52 pacientes estudados com seus diferentes genótipos.....	46
Tabela 4-	Apresentação dos fenótipos das <i>P. aeruginosa</i> na segunda coleta da secreção respiratória dos 52 pacientes estudados com seus diferentes genótipos.....	46
Tabela 5-	Tabela de Classificação do Padrão de RAPD da <i>Pseudomonas aeruginosa</i> - primer 208.....	50
Tabela 6-	Tabela de Classificação do Padrão de RAPD da <i>Pseudomonas aeruginosa</i> – primer 272.....	51
Tabela 7-	Padrão de RAPD das <i>P. aeruginosa</i> isolada dos 17 pacientes nos dois momentos da coleta.....	55

	PÁG.
Figura 1- Proteína CFTR.....	18
Figura 2- Deleção $\Delta F508$	20
Figura 3- Casuística do estudo.....	41
Figura 4- Faixa etária dos 52 pacientes que apresentaram cultura positiva para <i>P. aeruginosa</i>	42
Figura 5- Apresentação dos dois fenótipos das cepas de <i>P. aeruginosa</i> isoladas nos 52 pacientes nos dois momentos de coleta.....	43
Figura 6- Fenótipos das 40 cepas de <i>P. aeruginosa</i> obtida dos 17 pacientes..	48
Figura 7- Perfil de RAPD da <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	52
Figura 8- Perfil de RAPD da <i>Pseudomonas aeruginosa</i> de irmãos gêmeos...	53
Figura 9- Distribuição dos padrões de RAPD.....	54
Figura 10- Variabilidade fenotípica e genotípica da <i>P. aeruginosa</i>	56

RESUMO

A fibrose cística (FC) é uma doença multissistêmica, hereditária, limitante da vida. As infecções respiratórias, principalmente por *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) são responsáveis por repetidas exacerbações pulmonares, que evoluem para deterioração da função pulmonar, principal causa de morbi-mortalidade da FC. Este estudo teve como objetivo avaliar a variabilidade genotípica e fenotípica da *P. aeruginosa* isolada em dois momentos na evolução da doença pulmonar em pacientes com FC atendidos em um centro de referência. Foi realizado um estudo descritivo longitudinal. A secreção respiratória foi coletada sob a forma de escarro ou *swab* de orofaringe, efetuada sua identificação microbiológica e análise por Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). Os dados foram apresentados de forma descritiva e em tabelas, o programa utilizado foi o SAS versão 8.02. Foram incluídos 81 pacientes, 52 apresentaram *P. aeruginosa* e 29 não apresentaram, foram identificadas 71 cepas não - mucóide e 67 mucóide. RAPD identificou 14 padrões com o primer 208 e 10 padrões com o primer 272. Exceto no caso dos irmãos gêmeos, não foram observadas cepas com mesmo padrão. Em nosso estudo, verificamos heterogeneidade da *P. aeruginosa*, independente do fenótipo da colônia. Observamos que 35,29% dos pacientes mantiveram um único genótipo. Os resultados mostraram: uma distribuição homogênea das cepas mucóide e não-mucóide; ausência de relação entre o genótipo e o fenótipo da *P. aeruginosa*; heterogeneidade fenotípica e genotípica da *P. aeruginosa* entre os pacientes fibrocísticos e na evolução de um mesmo paciente; evidências de não aquisição da *P. aeruginosa* pelos pacientes no ambiente de nosso centro de atendimento; um único caso de infecção cruzada (gemelares).

Palavras-chave: fibrose cística, *Pseudomonas aeruginosa*, RAPD.

ABSTRACT

Cystic fibrosis (CF) is a multiorgan inherited disease, and it restricts life. The respiratory infections, mainly by *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), are responsible for repeated lung exacerbations, which progress to the deterioration of lung functioning, the main cause of morbi-mortality of CF. The purpose of this work was to analyze the variability of *P. aeruginosa* regarding its genetic and phenotypic characteristics isolated in two moments during the evolution of the lung disease in patients with CF. A longitudinal descriptive study was performed. Respiratory secretion was collected as sputum or oropharynx swab, its microbiological identification and analysis by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). The data were presented in a descriptive way and in tables; SAS 8.02 the program used. 81 of the patients were included, 52 presented *P. aeruginosa*, 29 didn't present it; non-mucoid strains were identified in 71 of the samples and mucoid strains in 67. RAPD identified 14 patterns with primer 208 and 10 patterns with primer 272. With exception of the twin siblings' case, strains with the same pattern were not observed. In our study, we verified high *P. aeruginosa* heterogeneity, independent of the colony phenotype. We observed that 35,29% of the patients conserved only one *P. aeruginosa* genotype. The results showed: a balanced distribution of mucoid and non-mucoid strains; that there isn't a relationship between the *P. aeruginosa* genotype and phenotype; there was a phenotypical and genotypical *P. aeruginosa* heterogeneity among patients with cystic fibrosis and in the evolution of the same patient; there was no evidence of acquisition of *P. aeruginosa* by the patients environment in our care centre; only one case of cross-infection (twins).

Keywords: cystic fibrosis, *Pseudomonas aeruginosa*, RAPD.

INTRODUÇÃO

1- Epidemiologia

A fibrose cística (FC) é uma doença geneticamente determinada com padrão de herança recessivo autossômico. Acomete aproximadamente 30.000 indivíduos nos Estados Unidos e 60.000 em todo o mundo. É a doença letal herdada mais comum na raça caucasóide, com incidência variando de 1/2000 a 3000 nascimentos em diversos países, está presente em menor frequência em hispânicos (1: 90.000), asiáticos (1:32.000) e em afro-americanos (1:15.000). No Brasil, a incidência na região sul é próxima da população caucasiana centro-européia, para outras regiões, diminui para cerca de 1/10.000 nascidos vivos (Reis e Damaceno, 1998; Gibson, 2003; Ribeiro et al., 2002).

Na FC, 1 a cada 25 pessoas é portadora assintomática do gene, quando ambos os pais tem um gene para a FC, em cada gestação, o risco de nascer um filho com a doença é de 25% , a probabilidade de nascer um filho saudável sem o gene é de 25%, enquanto a probabilidade de nascer um filho saudável, mas com um gene para FC, é de 50% (Ribeiro et al., 2002).

2- Fisiopatogenia da fibrose cística

A doença é causada por mutações no gene da FC, gene que transcreve uma proteína que se expressa na membrana apical das células epiteliais exócrinas. O gene localiza-se no braço longo do cromossomo 7, no locus q31, é formado por aproximadamente 250 Kb de DNA, 27 éxons e codifica um RNAm de 6,5 Kb, que é transcrito em uma proteína, composta por 1.480 aminoácidos, denominada Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) (Reis e Damaceno, 1998; Ribeiro et al., 2002; Gibson, et al, 2003).

2.1- Função da CFTR

A principal função da proteína CFTR é de atuar como um canal de cloro (Cl^-) nas membranas epiteliais, também atua na regulação de outros canais que tem um importante papel na patogênese da doença, como regular a via de sódio (Na^+) e o pH,

portanto mutações no gene da FC afetam o transporte epitelial de íons (Cl^- , Na^+) e água, principalmente nas células do trato respiratório, gastrointestinal, hepatobiliar e sistema reprodutivo. A mutação resulta na ausência ou funcionamento parcial da proteína CFTR, com prejuízo desta para alcançar o sítio de ação na membrana apical nas células, como a proteína funciona como canal de cloro nas membranas das células epiteliais conseqüentemente ocorrerá prejuízo no transporte de cloro para a superfície das células epiteliais, com redução na excreção de cloro, aumento do fluxo de sódio e água para o interior da célula, conduzindo à desidratação das secreções mucosas e aumento da viscosidade, propiciando a obstrução dos ductos, com conseqüente inflamação, alcançando o estágio da fibrose (Boucher, 2004; Brennan e Geddes, 2002; Davies, 2002; Gracia, 2005 Ribeiro et al, 2002; Rowe et al, 2005) (figura 1).

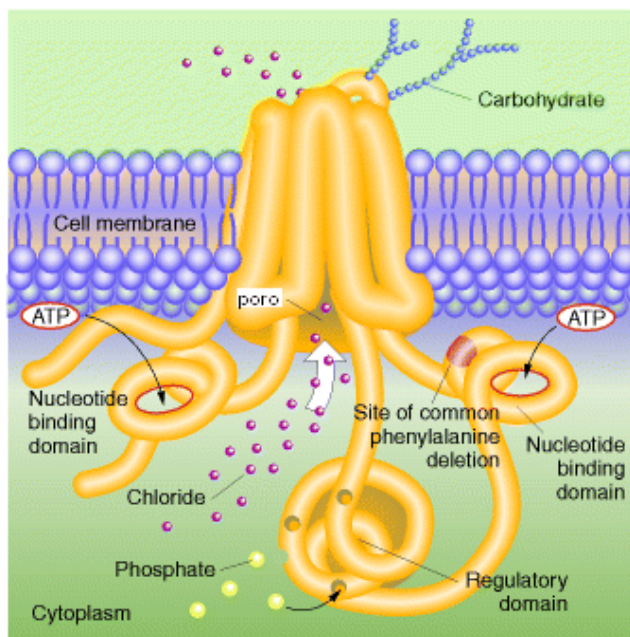


Figura 1- A proteína CFTR na usa função de atuar como um canal cloro-permeável na membrana celular externa. A figura mostra a estrutura da proteína da FC, pode-se observar o sítio de três nucleotídeos onde comumente ocorre deleção entre os alelos mutantes para FC (Freeman, 1999).

A figura 1 foi reproduzida a partir da página eletrônica:
http://paginas.terra.com.br/educacao/biolmol/GenéticaMedicina/Base_molecular_das_doencas.htm

2.2- Classificação das mutações

Com o aumento do conhecimento do processo e função da CFTR, bem como das mutações no gene, as mutações passaram a ser classificadas de acordo com o mecanismo que afetou a função normal da proteína CFTR:

- Classe I: CFTR não é sintetizada. Falência para produzir a proteína CFTR devido a mutações nonsense, frameshift, ou splice.
- Classe II: Defeito no processamento da proteína. Resulta numa proteína que falha em maturar, tais mutações são marcadas por subsequente degradação.
- Classe III: Defeito na regulação da proteína.
- Classe IV: Mutações que afetam as propriedades de condução dos canais.
- Classe V: Defeito parcial na produção ou no processamento da proteína. (Gracia, 2005). Mutações que podem resultar em quantidades reduzidas da proteína CFTR funcional. (Koch, 2001).
- Classe VI: Defeito na regulação de outros canais (Ratjen e Doring, 2003).

As classes 1 a 3 são as mais comumente encontradas e são associadas com insuficiência pancreática, enquanto nas classes raras, 4 a 6, os pacientes normalmente não a apresentam. Atualmente, mais de mil mutações são descritas, porém somente 22 mutações foram identificadas com uma frequência de no mínimo 0.1% dos alelos conhecidos. A mutação mais comum, encontra-se na classe 2 e ocorre por uma deleção de três pares de bases, resultando na perda de um aminoácido (fenilalanina) na posição 508 ($\Delta F508$) da proteína, 70% dos alelos para FC em brancos são $\Delta F508$ (Gibson et al, 2003; Ratjen e Doring, 2003) (figura 2).

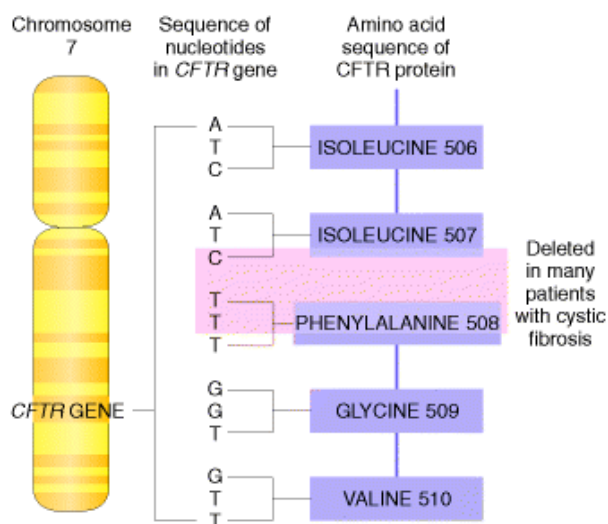


Figura 2- Gene da fibrose cística, cromossomo 7, à direita a figura mostra a forma como a deleção de três bases remove a fenilalanina da sequência ($\Delta F508$ - esta é a mutação mais freqüente em caucasóides) (Freeman, 1999).

A figura 2, que apresenta o gene da FC com a mutação $\Delta F508$ foi obtida de: http://paginas.terra.com.br/educacao/biolmol/GeneticaMedicina/Base_molecular_das_doencas.htm

2.3- Manifestações clínicas

A FC se expressa de maneira muito variável, pode se manifestar precocemente já no período neonatal, mas pode expressar-se somente na vida adulta, existem casos de pacientes que permaneceram assintomáticos por muitos anos (Reis e Damaceno, 1998). As manifestações clínicas mais freqüentes são tosse crônica, diarreia crônica e desnutrição, porém a FC pode se manifestar de diversas outras maneiras, devido ao fato de ser uma doença que acomete vários sistemas e órgãos. Outras manifestações incluem doença pulmonar obstrutiva supurativa progressiva, insuficiência pancreática que acarreta perda de gordura nas fezes e conseqüente baixo ganho ponderal, íleo meconial, icterícia neonatal prolongada, crescimento deficiente, pneumonias de repetição, sibilância, concentração de cloro e sódio elevados no suor, acarretando suor salgado e em situações de perda excessiva, desidratação hipoclorêmica e hiponatrêmica e infertilidade masculina. Pode também apresentar, de forma rara e tardia, cirrose hepática biliar focal, litíase biliar, hipertensão

portal com esplenomegalia e varizes esofageanas, doença celíaca, doença de Crohn, pancreatite crônica e diabetes melito. O acometimento do aparelho respiratório ocorre em mais de 95% dos pacientes, tem um importante acometimento com variável intensidade e o acometimento pulmonar determina o prognóstico final (Reis e Damaceno, 1998; Ribeiro et al., 2002).

2.4- Diagnóstico clínico e laboratorial

O diagnóstico da FC deve ser realizado o mais precocemente possível, envolve critérios clínicos e laboratoriais.

2.4.1- Os critérios clínicos incluem a apresentação fenotípica do paciente

- Doença pulmonar obstrutiva/supurativa ou sinusal crônica;
- Insuficiência pancreática exócrina;
- História familiar de FC;
- Infertilidade masculina;
- Doença hepática crônica.

2.4.2- Os critérios laboratoriais incluem

- Teste de suor – padrão áureo para o diagnóstico da FC, é considerado positivo quando a concentração de cloro é acima de 60 mEq/l;
- Estudo genético – identificação de duas mutações conhecidas, o que contribui para a confirmação do diagnóstico, principalmente em pacientes com teste de suor duvidosos;

- Triagem neonatal – pelo método da Tripsina Imunorreativa (IRT);
- Medidas da diferença do epitélio nasal;
- Testes de função pancreática exócrina – a maioria dos pacientes com FC apresentam função pancreática anormal;
- Detecção de enzimas nas fezes;
- Diagnóstico pré-natal (Ribeiro et al., 2002; Reis e Damaceno, 1998).

3- Doença pulmonar

A doença pulmonar é caracterizada por acúmulo de secreção espessa e purulenta, infecções respiratórias recorrentes, perda progressiva da função pulmonar e clearance mucociliar diminuído, que conduz à sinusite, bronquite, pneumonia, bronquiectasia, fibrose e falência respiratória, o acometimento da função pulmonar é progressivo e de intensidade variável (Ribeiro et al., 2002; Reis e Damaceno, 1998).

Ao nascimento, os pacientes com FC apresentam os pulmões aparentemente normais, seguidos por infecções bacterianas no trato respiratório até os primeiros cinco anos de vida, estudos têm relatado o papel da CFTR no período fetal, o que sugere que a CFTR pode desempenhar função na diferenciação celular pulmonar intra-utero (Davies et al., 2002). A doença pulmonar caracteriza-se por um ciclo vicioso de inflamação e infecção bacteriana que levam a dano tissular irreversível (Boucher, 2004; Ribeiro et al., 2002; Saiman, 2004).

O prejuízo na CFTR leva a defeito no líquido de superfície das vias aéreas, adesão bacteriana e à resposta inflamatória, estes defeitos levam a recorrentes infecções respiratórias, com um limitado número de patógenos (Brennan e Geddes, 2002). Geralmente, *P. aeruginosa* é o patógeno mais comum, seguido por *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* e *Stenotrophomonas maltophilia*. O exato papel da disfunção da CFTR e da seqüência de eventos que levam a infecção crônica nas vias aéreas é controverso e não é completamente compreendido (Davies, 2002). Diversas são as hipóteses entre a relação da mutação na CFTR e o desenvolvimento destas infecções:

- Hipótese da inflamação primeira – propõe que a inflamação está presente nas vias aéreas do paciente nos primeiros meses de vida antes da infecção, porém outros autores não concordam com esta hipótese e enfatizam que a inflamação é seguida pela infecção (Ratjen e Doring, 2003).
- Hipótese do receptor de célula – sugere que as organelas das células na FC são mais ácidas ou alcalinas do que as organelas de células normais, e que o pH alterado aumenta a formação asialogangliosídeo-1 (asialo-GM1) na superfície das células epiteliais, asialo GM1 é um receptor para muitos patógenos bacterianos, a ligação dos patógenos às moléculas de asialo GM1 é mediada pelos pilos e flagelos, resultando no aumento da aderência de *P. aeruginosa* e *S. aureus* nessas células. (Ratjen e Doring, 2003; Brennan e Geddes, 2002).
- CFTR como receptor da *P.aeruginosa* - A CFTR pode atuar como um receptor para *P.aeruginosa*, que com sua função normal internaliza e fagocita o patógeno dentro da célula epitelial, isto pode permitir a clearance da *Pseudomonas* das vias aéreas, reduzindo o número de bactérias. Há evidência que a mutação na CFTR reduz este mecanismo facilitando que a *P.aeruginosa* persista e infecte a via aérea (Ratjen e Doring, 2003; Brennan e Geddes, 2002; Gibson et al, 2003).
- Alterações no líquido de superfície nas vias aéreas (ASL) – Mutações na CFTR levam a defeito no transporte de íons Cl^- através da superfície apical da células epiteliais nas vias aéreas. A hipótese é baseada no fato de que as células epiteliais das vias aéreas na FC têm propriedades similares as glândulas de suor:
 - Hipótese Composicional / Teoria da alta concentração de sal: na via aérea normal, o ASL é hipotônico, uma vez que a concentração de sal está aumentada no ASL os peptídeos antimicrobianos são inativados (concentração de sal maior que 50 mmol/L), a bactéria pode se multiplicar na superfície epitelial das células, isto pode resultar no aumento da susceptibilidade a infecções.

- Hipótese do Baixo Volume / Depleção de fluido isotônico - a absorção aumentada de Na⁺ nas vias aéreas junto a falência da CFTR em secretar Cl⁻ conduz a depleção do volume (água) periciliar, a perda de água aumenta a viscosidade do muco e prejudica a clearance mucociliar, favorecendo infecções. (Ratjen e Doring, 2003; Davies, 2002; Gibson et al, 2003).
- Óxido Nítrico – O óxido nítrico apresenta atividade contra vírus e bactérias, a redução do óxido nítrico nas vias aéreas na FC pode propiciar aumento na susceptibilidade a patógenos (Brennan e Geddes, 2002).

Os principais mecanismos de defesa pulmonar contra a colonização bacteriana são a clearance mucociliar, fagocitose por neutrófilos polimorfo nucleares e a produção local de peptídeos catiônicos antibacterianos. Estes sistemas de defesa são pobremente eficazes sob condições de aumento da viscosidade e osmolaridade, resultando em infecção pulmonar crônica, mais freqüentemente por *P. aeruginosa*. Todavia os pulmões de pacientes fibrocísticos são ricos em compostos orgânicos para o crescimento bacteriano, a bactéria tem a necessidade de continuamente desenvolver-se para adaptar-se as limitações dentro de fatores de crescimento específicos, desidratação, influxo de leucócitos, deterioração do tecido pulmonar e freqüente alteração e prolongada antibioticoterapia (Oliver et al, 2000).

As infecções pulmonares crônicas são caracterizadas por exacerbação aguda recorrente com febre, perda de peso, aumento da tosse, alteração no volume, cor, ou aparência do escarro, taquipnéia, dispnéia e roncos no exame do tórax com o aparecimento de infiltrados na radiografia de tórax, progressiva deterioração da função pulmonar pode ser observado por testes de função pulmonar (Gilligan, 1991).

4- O microrganismo *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa é um microorganismo que pode infectar indivíduos imunocomprometidos e é responsável por infecções nosocomiais. A bactéria é o patógeno respiratório predominante e clinicamente importante em pacientes com FC, que afeta a

função pulmonar e a sobrevivência. É um bacilo gram-negativo ambiental, encontrado em água, solo, em áreas úmidas tais como pias e ralos. Na maioria das situações clínicas é de baixa virulência, sendo um patógeno oportunista no hospedeiro com defesa antibacteriana comprometida (Brennan e Geddes, 2002; Davies, 2002; Speert et al, 2002; Spencer et al, 2003; Saimam e Siegel, 2004; Lanotte et al, 2002).

Pacientes com FC são particularmente susceptíveis a infecção pulmonar crônica por *P. aeruginosa*, constituindo a principal causa de morbidade e mortalidade, que pode ser acompanhada de deterioração da função pulmonar, precedendo falência respiratória. Após a colonização a bactéria raramente é erradicada, independente da antibioticoterapia empregada (Lanotte et al, 2004; Anthony et al, 2002; Speert et al, 2002; Silbert et al, 2001).

4.1- Fenótipos da *Pseudomonas aeruginosa*

A persistência da *P. aeruginosa* em colonizar as vias aéreas de pacientes com FC é associada à excessiva produção capsular de polissacarídeo conhecido como alginato, um polímero que protege o microrganismo contra as defesas do hospedeiro e permite que a bactéria sobreviva dentro do pulmão, aumentando a resposta inflamatória nas vias aéreas (Silva, 2001; Head e Yu, 2003). A colonização inicial é normalmente devida a isolados de fenótipo não-mucóide, as cepas mucóides emergem e tornam-se predominantes e a infecção torna-se crônica, esta é uma das características clinicamente mais importante da bactéria. O fenótipo mucóide é muitas vezes instável, com uma grande porcentagem de isolados revertendo seu fenótipo para não-mucóide durante a cultura *in vitro* (Lyczak, 2002). Além disso, a doença pulmonar é manifestada com endobronquite relacionada à presença de cepas *P. aeruginosa mucóide* e uma vez estabelecida na via aérea raramente são erradicadas, mesmo com agressiva antibioticoterapia (Silva, 2001) Crianças infectadas com *P. aeruginosa* apresentam piora da função pulmonar, pior escore em radiografia de tórax e sobrevida reduzida em 10 anos quando comparadas com crianças que não são infectadas com *P. aeruginosa*. O fenótipo mucóide foi associado com deterioração da função pulmonar e morte precoce. Com o tempo, as cepas de *P. aeruginosa* tornam-se altamente resistentes a agentes antimicrobianos e terapias efetivas tornam-se mais difíceis (Saimam e Siegel, 2004). Estudos indicam que acima de 90% dos pacientes com FC

adquirem *P. aeruginosa* durante a sua vida e, uma vez que os pulmões foram colonizados, é impossível erradicar por tratamento com antibióticos, persistindo até a morte do paciente (Kerem et al., 1989).

O aparecimento da *P. aeruginosa* em pacientes com FC não é completamente compreendido, diversos são os estudos que tentam identificar o seu aparecimento. Uma larga distribuição de genótipos de *P. aeruginosa* foi demonstrada em crianças sugerindo que a aquisição é ambiental e raramente pacientes com FC apresentam o mesmo genótipo da *P. aeruginosa*, ocorrendo somente quando estes são irmãos ou tem um vínculo social (Gibson et al., 2003). Segundo Saiman e Siegel (2004) pacientes com FC podem abrigar a mesma cepa de *P. aeruginosa*, mas estudos epidemiológicos não confirmaram a aquisição da *P. aeruginosa* do meio ambiente, a transmissão paciente-paciente geralmente resultado de contato prolongado. Estudos epidemiológicos usam diferentes métodos de tipagem para *P. aeruginosa*, estes também sugerem que a transmissão pode ocorrer por contato direto paciente-paciente, além disso, a transmissão da *P. aeruginosa* em pacientes com FC pode ocorrer via reservatório ambiental contaminado. Centros especializados em FC segregaram os pacientes com e sem infecção por *P. aeruginosa* com o objetivo de limitar a infecção cruzada. Medidas de higiene para descontaminar reservatórios ambientais de *P. aeruginosa* incluindo nebulizadores, outros equipamentos médicos, pias, banheiros e tubo de pasta dental são recomendadas, desinfecção das mãos de pacientes com FC e dos profissionais do hospital foi enfatizada (Doring et al., 2000).

4.2- Características Genéticas da *Pseudomonas aeruginosa*

A habilidade da *P. aeruginosa* em adaptar-se e sobreviver em diversos ambientes é devida em parte a sua grande versatilidade genética, o que contribui significativamente para a sua potencialidade como patógeno (Finnan et al., 2004; Head e Yu, 2003).

Há descrições na literatura de que uma vez colonizado com *P. aeruginosa*, a maioria dos pacientes tende a abrigar o tipo conservado durante o curso da doença. Pacientes também podem abrigar variantes do clone original, que são caracterizados por

menores diferenças no genoma. Contrariamente, Boukadida et al (1993), encontrou cepas distintas no mesmo paciente, indicando que pode ser relativamente alta a heterogeneidade de cepas de *P. aeruginosa* na microbiota pulmonar de pacientes infectados cronicamente.

Os pacientes que são tratados com antibioticoterapia para erradicar a *P. aeruginosa* podem ter infecções recorrentes com a cepa inicial após a supressão transitória desta. (Saiman e Siegel, 2004; Silbert et al, 2001). Se o reaparecimento da *P. aeruginosa* depois da terapia antimicrobiana representa infecção com uma nova cepa ou incapacidade para remover a cepa preexistente não se sabe. Até recentemente, marcadores epidemiológicos usados para abordar esta questão, tais como, serotipagem, fenotipagem, piocina e antibiogramas foram imprecisos. Preliminarmente trabalhos com genética molecular sugerem que genótipos persistem durante e depois da terapia antimicrobiana e que mais de um genótipo pode estar presente nos pulmões ao mesmo tempo, além do que os genótipos também podem mudar todo tempo (Gilligan, 1991).

Segundo os resultados do estudo de Silbert et al (2001), pacientes com FC permanecem colonizados por mais de uma cepa de *P. aeruginosa* por longos períodos de tempo. Além disso, os achados de diversos isolados com genótipos distintos no mesmo paciente sugerem que a colonização pela cepa pode ocasionalmente ser restabelecida. Co-infecção com uma ou mais cepas e substituição de cepas também são relatadas (Jung et al, 2002).

Análises por tipagem genômica da *P. aeruginosa* em isolados de fibrocísticos demonstraram que muitos destes são cronicamente colonizados com isolados de um ou pequeno número de linhagens por prolongado período de tempo. Todavia, a alta frequência de hiper-mutabilidade de cepas de *P. aeruginosa* em pacientes com FC foi sugerida em recentes estudos realizados por Oliver et al. (2000).

Estudos genéticos indicaram que a maioria dos pacientes com FC são colonizados por um único clone ou por subclones de *P. aeruginosa* e o aparecimento de cepas distintas foi associado com cursos prévios de antibioticoterapia, por esta razão a epidemiologia de *P. aeruginosa* em pacientes com FC pode variar em diferentes centros médicos (Anthony, et al., 2002; Silbert et al., 2001).

4.3- Identificação da *Pseudomonas aeruginosa*

Devido à capacidade de adaptação da *P. aeruginosa*, as técnicas normalmente empregadas nos laboratórios para a identificação e caracterização microbiana não possuem sensibilidade e especificidade para esclarecer com certeza a identidade de um isolado bacteriano, por isso é necessário desenvolver sistemas de identificação genotípica, que são capazes de identificar e caracterizar de maneira precisa os microrganismos independentes da modificação no fenótipo da bactéria (Ortiz-Herrera et al., 2004).

Técnicas de identificação baseadas em fenotipagem (piocina, sorotipagem) podem não ser suficientemente discriminatórias, já que as cepas apresentam diferentes fenótipos e uma identificação acurada só é possível por métodos de biologia molecular (Mccallum et al, 2001). Técnicas de tipagem genética foram apresentadas por serem mais discriminatórias do que métodos fenotípicos para tipagem dos isolados de *P. aeruginosa* na FC (Mahenthiralingam, et al. 1996).

Em estudos são descritos sistemas genotípicos de identificação destinados a caracterização de isolados de *P. aeruginosa* de pacientes com FC, como hibridização com sondas específicas, pulsed-field-gel-eletroforesis (PFGE), normalmente as técnicas de identificação requerem certo conhecimento prévio, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que requer o conhecimento dos nucleotídeos que compõem as duas extremidades da sequência de DNA que se deseja amplificar, uma adaptação é a amplificação do DNA empregando a PCR em baixas condições de especificidade (Random amplified polymorphic dna) (Ortiz-Herrera et al., 2004).

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) ou Amplified Polymorphism – Polymerase Chain Reaction (AP-PCR), foi desenvolvido sanando a questão do prévio conhecimento da sequência de DNA a ser amplificada, o RAPD é um processo simples e rápido, cuja amplificação do DNA genômico é baseada em um primer único com uma sequência de nucleotídeos arbitrária, permitindo desta forma a utilização da técnica em organismos onde não havia conhecimento da sequência de DNA (Williams et al., 1990).

RAPD é uma técnica altamente acessível, por ser rápida, de baixo custo e pouco intensiva em mão-de-obra. Apesar de ter sido desenvolvida recentemente, já são inúmeros os trabalhos que analisam e estimam diversidade genética de diferentes espécies animais e

vegetais utilizando a técnica. Atualmente é empregada no estudo da relação parasita – hospedeiro entre a *P. aeruginosa* e pacientes com FC principalmente em estudos epidemiológicos de prevalência de diferentes cepas, infecção cruzada e re-infecção por *P. aeruginosa* (Ortiz-Herrera et al., 2004).

Mahenthiralingam et al (1996), em seu estudo sobre RAPD com *P. aeruginosa* isoladas de pacientes com FC, detectou oito primers eficazes na identificação da bactéria e utilizou os primers 272 e 208 para seu estudo. Quando compararam os resultados obtidos por RAPD e PFGE, verificaram que as cepas encontradas por ambos métodos apresentaram exata correlação. Kersulyte et al. (1995), obtiveram em seu estudo que os resultados do RAPD são concordantes com tipagem por macro-restrição do DNA nos isolados de *P. aeruginosa* na FC e concluiu que o RAPD pode servir como um método eficiente e sensível para a tipagem das cepas de *P. aeruginosa*.

JUSTIFICATIVA

O Ambulatório de Pediatria do HC da UNICAMP atende cerca de 120 pacientes com FC. Muitos destes apresentam infecção por *P. aeruginosa* de forma precoce, em torno dos dois anos de idade, havendo casos com início da colonização nos primeiros meses de vida. Infecção respiratória crônica por *P. aeruginosa* é significativamente determinante no prognóstico de pacientes com FC, por ser usualmente seguida por deterioração da função pulmonar e redução da sobrevivência (Armstrong et al, 2002; Alvarez et al, 2004; Silva et al, 2001).

A infecção cruzada em pacientes com FC permanece um assunto discutido, autores referem que só ocorre entre irmãos ou quando os pacientes possuem um contato íntimo e prolongado. Lyzcak et al (2007) refere que a infecção pode resultar do contato social ou ser adquirida no ambiente hospitalar, mas a diversidade de clones de *P. aeruginosa* dos pacientes sugere que a origem de muitos isolados clínicos é ambiental. Armstrong et al (2002) e Jones et al (2002) sugeriram em seus estudos que pacientes colonizados por *P. aeruginosa* de genótipo transmissível apresentam um pior prognóstico e aumento da necessidade de tratamento com antibioticoterapia intravenosa.

Efetivos programas de controle de infecção são baseados no conhecimento do microrganismo e sua difusão. Adequada supervisão microbiológica é essencial, determinando a prevalência de cepas de *P. aeruginosa* epidêmicas na população fibrocística, para potencial prevenção da aquisição e disseminação destas (Jones et al, 2001). A análise molecular das bactérias é parte integral de programas de controle de infecção, uma vez que as cepas da *P. aeruginosa* apresentam diferentes fenótipos e genótipos, o que justifica promover investigações (Anthony et al, 2002).

Segundo Silva, et al (2001), desenvolver técnicas adequadas para tipagem das cepas de *P. aeruginosa* para medidas de controle de infecção são necessárias, pois, a susceptibilidade a antibióticos e outros métodos de fenotipagem, como serotipagem não são confiáveis para estudos epidemiológicos.

PFGE é o método de escolha para tipagem das cepas de *P. aeruginosa*, é um método sensível e específico, porém é dispendioso e demorado (Mccallum et al, 2001; Jones et al, 2001; Ortiz-Herrera, 2004). Campbell, et al (2000), em posterior estudo

concluiu que o RAPD é um método simples e altamente reproduzível e deve ser utilizado para esclarecer a epidemiologia da *P. aeruginosa* em pacientes com FC. Mahenthiralingam et al, (1996) detectaram entre cem primers, oito efetivos para amplificar as reações de RAPD de *P. aeruginosa* em pacientes com FC, os primers funcionais foram todos com alto conteúdo de GC (guanina, citocina), os primers 272 e 208 foram escolhidos para o estudo, os demais não foram avaliados.

A análise longitudinal da *P. aeruginosa* quanto as suas características genéticas faz-se necessária, pois estudos transversais não acompanham o comportamento da bactéria durante a infecção pulmonar, e por meio deste obteremos informações que permitirão direcionar intervenções terapêuticas, possibilitando a abertura de novos caminhos contra este patógeno, desde a coleta da secreção respiratória até o emprego da antibioticoterapia, otimizando a conduta perante a doença pulmonar.

OBJETIVOS

Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi avaliar a variabilidade genotípica e fenotípica da *Pseudomona aeruginosa* isolada em dois momentos na evolução da doença pulmonar em pacientes com fibrose cística atendidos em um centro de referência.

Objetivos específicos

- 1- Avaliar a aplicabilidade do método RAPD em nosso serviço.
- 2- Classificar as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de acordo com os fenótipos e os genótipos conforme o padrão de RAPD.
- 3- Verificar a existência de infecção cruzada em nosso centro.
- 4- Verificar a existência de relação entre o genótipo e o fenótipo da *P. aeruginosa*.

MATERIAIS E MÉTODOS

1- Delineamento do estudo

Foi realizado um estudo descritivo longitudinal com os pacientes acompanhados no Ambulatório de Fibrose Cística do Departamento de Pediatria do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) no período de agosto de 2004 a outubro de 2005. A pesquisadora foi responsável pelo acompanhamento dos pacientes, realização das coletas e análises laboratoriais.

Os dados foram armazenados em uma ficha elaborada para o estudo, onde foram registradas informações sobre o paciente. O protocolo utilizado verificou dados de identificação: idade (definida em anos e meses, a partir da data da primeira coleta), gênero (masculino e feminino); análise da mutação genética para fibrose cística; análise microbiológica (agente microbiano encontrado na cultura de escarro), com estudo do fenótipo da *P. aeruginosa*; análise das informações genéticas da *P. aeruginosa*, consideradas a partir do método RAPD (apêndice 1).

2- Sujeitos

O ambulatório de FC acompanha 120 pacientes. Participaram do estudo 81 pacientes fibrocísticos, que preencheram os critérios de inclusão.

3- Critérios de inclusão

Foram incluídos no estudo os pacientes com diagnóstico confirmado de fibrose cística, por dois testes de suor alterados (concentração de cloro acima de 60mEq/l) e/ou estudo genético com duas mutações, presença de manifestações clínicas próprias da doença (acometimento respiratório) e que mantiveram acompanhamento regular no Ambulatório de Fibrose Cística da UNICAMP.

4- Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo os pacientes sem evidências de acometimento respiratório, que recusaram a participar do estudo, que não aderiram ao acompanhamento no Ambulatório de Fibrose Cística do Hospital das Clínicas da UNICAMP ou quando a coleta da secreção respiratória não foi possível.

5- Microbiologia

5.1- Fenótipos da *Pseudomonas aeruginosa*

Os fenótipos da *P. aeruginosa* foram classificados a partir da morfologia das colônias em mucóide e não mucóide de acordo com Vandame et al, 2003.

5.2- Coleta do material

A coleta da secreção respiratória foi realizada nos dias de atendimento ambulatorial. Para este estudo foram realizadas duas coletas com intervalo de seis meses, estas foram sempre precedida por técnicas de fisioterapia respiratória (Wolfgang et al, 2003; Moore et al, 2004). O material foi coletado por expectoração direta (sob a forma de escarro) em um recipiente plástico estéril quando o paciente conseguiu expectorar espontaneamente, quando este não conseguiu espontaneamente, a coleta foi realizada por meio de swab de orofaringe estéril, pela fricção direta na região posterior da faringe, estimulando desta forma a tosse do paciente para obter secreção das vias aéreas inferiores. Após a coleta o material foi identificado com o registro do paciente e encaminhado ao Laboratório de Microbiologia da Divisão de Patologia Clínica do Hospital das Clínicas da UNICAMP.

5.3- Isolamento das cepas de *Pseudomonas aeruginosa*

Os microrganismos isolados foram identificados de acordo com técnicas clássicas utilizadas na rotina da Seção de Microbiologia da Divisão de Patologia Clínica do Hospital das Clínicas da UNICAMP, sendo a secreção respiratória semeada em ágar

sangue, ágar MacConkey, ágar chocolate, caldo tioglicolato, sabaurad dextrose e ágar Burkholderia cepacia e incubadas por um período de 18 a 48hs a uma temperatura de 36°C \pm 1°C (Kiska et al, 1996). Quando necessário, foi utilizada identificação por método automatizado (Vitek, Biolab Merieux), também disponível na rotina. As cepas de *P. aeruginosa* foram então removidas da placa de cultura primária para eppendorfs de 1,5 ml contendo BHI (brain heart infusion) e glicerol e congeladas em freezer a - 80°C (Burns et al, 2001).

6- Genotipagem

6.1- Genótipos da *Pseudomonas aeruginosa*

A determinação dos genótipos da *P. aeruginosa* foram realizados pelo método RAPD, com a utilização dos primers 272 (5'AGCGGGCCAA3') e 208 (5'ACGGCCGACC3').

6.2- Isolamento do DNA genômico da *Pseudomonas aeruginosa*

A extração do DNA das cepas de *P. aeruginosa* isoladas do meio de cultura foi realizado pelo método fenol-clorofórmio (De Araújo et al, 1996).

6.3- Reações RAPD

O DNA extraído foi amplificado utilizando os primers 272 (5'AGCGGGCCAA3') e 208 (5'ACGGCCGACC3') (Mahenthiralingam et al, 1996).

A reação foi realizada em volume de 50 μ l, com a seguinte concentração de reagentes 100 mM de cada desoxirribonucleotídeo trifosfato (dATP, dTTP, dGTP, dCTP); 40 pmoles do iniciador; 2,5 unidades de Taq DNA polimerase; 1,5 μ M de MgCl₂ presentes no tampão específico da enzima e 1 μ g de DNA genômico.

A amplificação foi realizada em um aparelho ciclador de temperatura e consistiu de uma desnaturação inicial de 4 ciclos de 5 minutos a 94°C; 5 minutos a 36°C; 5 minutos a 72°C; 30 ciclos de 1 minuto a 94°C; 1 minuto a 36°C; 2 minutos a 72°C; seguido por um final com uma distância de 72°C por 10 minutos (Mahenthiralingam et al, 1996).

Os produtos do RAPD foram então separados por eletroforese em gel de agarose a 1.5% com tampão 1 x TBE correndo a 9 V/cm por 3h. O padrão do tamanho molecular foi incluído todos géis, a coloração utilizada foi o brometo de etídio e os mesmos foram fotografados e analisados (Mahenthiralingam et al, 1996).

7- Estatística

Os dados foram apresentados de forma descritiva, utilizando medidas de tendência central (média) e de dispersão (desvio-padrão), porcentagens e em tabelas.

O teste de Wilcoxon para amostras relacionadas foi utilizado para avaliar a variabilidade genética da *P. aeruginosa* nos dois momentos de coleta.

Para comparar os fenótipos entre os dois momentos de coleta foi feita uma tabela de contingência cruzando as informações dos dois momentos, e utilizado o teste de simetria de Bowker (extensão do teste de McNemar) para dados relacionados.

O nível de significância adotado para o teste estatístico foi de 5% ($P < 0.05$).

O programa estatístico utilizado foi o Statistical Analysis System (SAS) versão 8.02.

8- Comitê de ética

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (anexo 1).

RESULTADOS

Características da População

Dos 120 pacientes acompanhados no ambulatório de FC, 81 (67,5%) preencheram os critérios de inclusão, com um caso de gemelaridade; 26 foram excluídos, 24 por não preencherem os critérios de inclusão (não finalizaram as coletas), 2 evoluíram à óbito no período do estudo, 13 não foram estudados (não foi obtida nenhuma coleta) (figura 3).

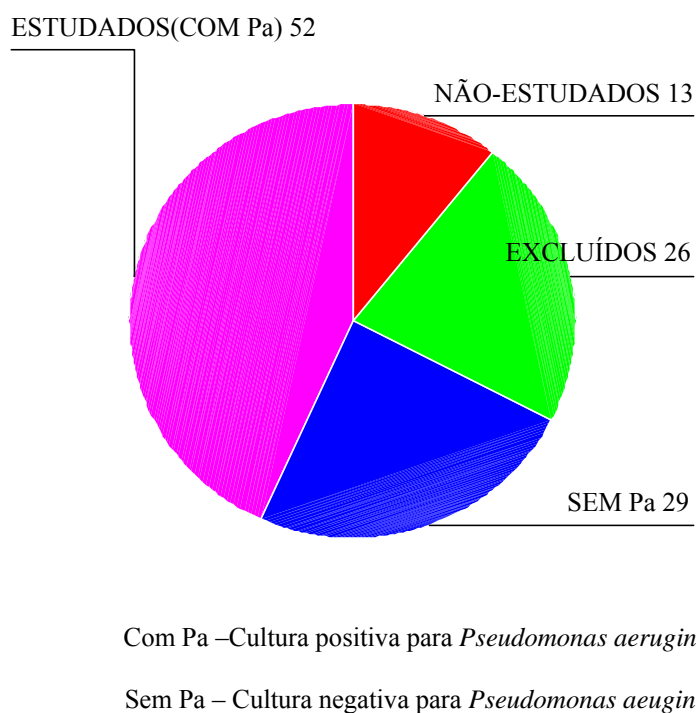


Figura 3- Casuística do estudo: 120 pacientes avaliados, 81 incluídos (52 com cultura positiva para *P. aeruginosa* e 29 com cultura negativa para *P. aeruginosa*).

Entre os 81 pacientes incluídos no estudo (média de idade= 9,11 anos e dp= 6,76 anos), 52 (64,2%) pacientes apresentaram *P. aeruginosa* (média de idade 9,82 anos, mediana de 8,87 anos e dp = 6,92 anos), a faixa etária de pacientes que predominou *P. aeruginosa* neste grupo foi de 5 a 9 anos de idade (figura 4); 29 (35,8%) não apresentaram em nenhuma coleta cepas de *P.aeruginosa* (média de idade= 7, 84 anos e dp= 6, 38 anos).

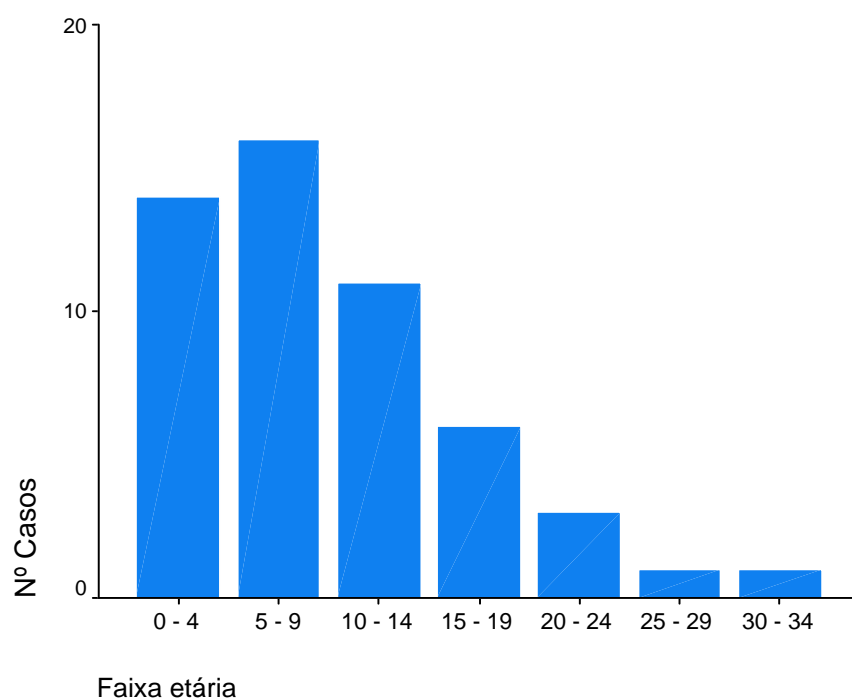


Figura 4- Faixa etária dos 52 pacientes que apresentaram cultura positiva para *P. aeruginosa*.

Quanto aos gêneros a distribuição foi 57,7% feminino e 42,3% masculino. No estudo genético a mutação $\Delta F508$ em heterozigose com mutação desconhecida no outro alelo, foi observada em 32,7% dos cromossomos avaliados, homozigotos para $\Delta F508$ 32,7%, heterozigotos para $\Delta F508/G542X$ em 9,6%, heterozigotos para $\Delta F508/R1162X$ em 1,9%, $\Delta F508/R553X$ em 1,2%, $\Delta F508/N1303K$ em 3,8%, $G542X/R1162X$ em 1,9%, $G542X/-$ em 1,9% e em 15,4% dos cromossomos avaliados a mutação genética não foi identificada.

Identificação Fenotípica dos Isolados de *Pseudomonas aeruginosa*

Nas secreções coletadas dos 52 pacientes com *P. aeruginosa*, nos dois momentos, foram identificadas 138 cepas, das quais 71 (51,44%) cepas identificadas foram do fenótipo não - mucóide e 67 (48,55%) mucóide. Em 33 (63,46%) pacientes, foram observados os dois fenótipos independentemente da coleta; 13 (25%) apresentaram apenas um fenótipo em um momento e 6 (11,53%) apresentaram apenas um fenótipo e o mantiveram nas duas coletas (tabela 1, figura 5).

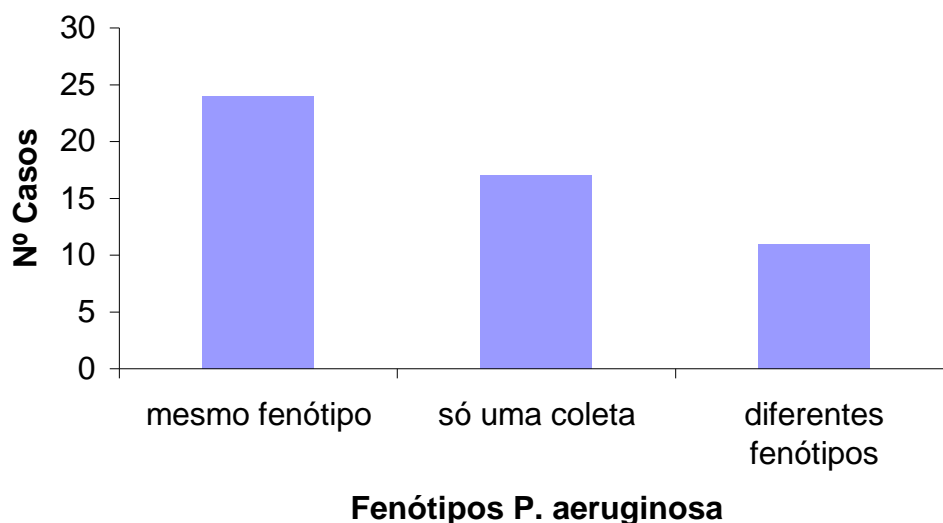


Figura 5- Apresentação dos dois fenótipos das cepas de *P. aeruginosa* isoladas nos 52 pacientes nos dois momentos de coleta.

Tabela 1- Distribuição dos fenótipos das *Pseudomonas aeruginosa* (*P.aeruginosa*) nos 52 pacientes, nos dois momentos de coleta.

Pacientes 1ª ao 26º	Fen1	Fen2	Pacientes 27º ao 52º	Fen1	Fen2
1		nM	27	M	M
2		M+Nm	28	Nm	Nm
3	M+Nm	M+Nm	29	M	M
4		Nm	30		Nm
5	M+Nm	M+Nm	31	M+Nm	M
6		M+Nm	32	M	
7	M+Nm	M+Nm	33	M+Nm	M+Nm
8	Nm		34	M+Nm	M+Nm
9		Nm	35	M+Nm	M
10	M+Nm	M+Nm	36	M+Nm	M+Nm
11	Nm		37		Nm
12	M+Nm	M	38	Nm	
13	M+Nm	M+Nm	39	Nm	
14	Nm	Nm	40	M	M+Nm
15	M+Nm	Nm	41	M+Nm	M+Nm
16	Nm		42	M	M
17		M+Nm	43	Nm	M+Nm
18	M+Nm	M	44		M+Nm
19	M+Nm	M+Nm	45	M+Nm	M+Nm
20	M+Nm	M	46	M+Nm	M+Nm
21	Nm		47	M+Nm	M+Nm
22	M+Nm	M+Nm	48	M+Nm	Nm
23	M	M+Nm	49	Nm	M+Nm
24	M+Nm	M+Nm	50	M+Nm	M+Nm
25	M	M	51	M+Nm	M+Nm
26	M+Nm	M+Nm	52	Nm	

M – *Pseudomonas aeruginosa* mucóide

Nm – *Pseudomonas aeruginosa* não-mucóide

Fen 1 – Fenótipo da *P. aeruginosa* na primeira coleta

Fen 2 – Fenótipo da *P. aeruginosa* na segunda coleta

Análise Comparativa dos Fenótipos entre os 2 Momentos

A tabela 2, a seguir, apresenta a tabela de contingência cruzando os fenótipos entre os 2 momentos de coleta para os n=52 pacientes com fibrose cística. Pelos resultados, verifica-se que não houve mudança significativa dos fenótipos entre os 2 momentos. Os valores da diagonal principal da tabela de contingência referem-se aos pacientes que permaneceram estáveis. Por exemplo, n=18 pacientes tinham M+Nm tanto no momento 1 como no momento 2. A maioria dos pacientes tem fenótipo M+Nm em ambos os momentos (48.1% no momento 1 e 50.0% no momento 2).

Tabela 2- Análise comparativa do fenótipo entre os 2 momentos.

Fen1	Fen2				Total
Frequency,	NÃO TEM	M	Nm	M+Nm	
Percent					
NÃO TEM	0	0	5	4	9
	0.00	0.00	9.62	7.69	17.31
M	1	4	0	2	7
	1.92	7.69	0.00	3.85	13.46
Nm	7	0	2	2	11
	13.46	0.00	3.85	3.85	21.15
M+Nm	0	5	2	<u>18</u>	25
	0.00	9.62	3.85	<u>34.62</u>	<u>48.08</u>
Total	8	9	9	26	52
	15.38	17.31	17.31	<u>50.00</u>	100.00

TESTE DE SIMETRIA DE BOWKER: S=6.62; GL=6; P=0.358

NÃO TEM - sem cultura positiva para *P. aeruginosa*; M - *P. aeruginosa mucóide*; NM - *P. aeruginosa não mucóide*; M+NM - *P. aeruginosa mucóide*+ *P. aeruginosa não mucóide*

Nas mutações para FC identificadas em nossa casuística, *P. aeruginosa* predominou nas mutações $\Delta F08/\Delta F508$ e $\Delta F508/-$. As mutações para FC dos 52 pacientes estudados e os fenótipos da *P. aeruginosa* encontrados nos dois momentos de coleta nas mutações identificadas estão apresentadas nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3- Apresentação dos fenótipos das *P. aeruginosa* na primeira coleta da secreção respiratória dos 52 pacientes estudados com seus diferentes genótipos.

		COLETA 1				Total
		SEM PA	PAM	PANM	PAM+PANM	
MUTAÇÃO	-/-	1	1	2	4	8
	DF508/-	5	1	1	10	17
	DF508/DF508	3	3	7	4	17
	DF508/G542X			1	4	5
	DF508/R1162X				1	1
	DF508/N1303K		2			2
	G542X/R1162X				1	1
	G542X/-				1	1
Total		9	7	11	25	52

Coleta 1 – Primeira coleta; SEM PA – Sem *Pseudomonas aeruginosa*; PAM – *Pseudomonas aeruginosa* mucóide; PANM – *Pseudomonas aeruginosa* não-mucóide

Tabela 4- Apresentação dos fenótipos das *P. aeruginosa* na segunda coleta da secreção respiratória dos 52 pacientes estudados com seus diferentes genótipos.

		COLETA 2				Total
		SEM PA	PAM	PANM	PAM+PANM	
MUTAÇÃO	-/-	1		2	5	8
	DF508/-	1	2	2	12	17
	DF508/DF508	5	2	5	5	17
	DF508/G542X	1	1		3	5
	DF508/R1162X		1			1
	DF508/N1303K		2			2
	G542X/R1162X				1	1
	G542X/-		1			1
Total		8	9	9	26	52

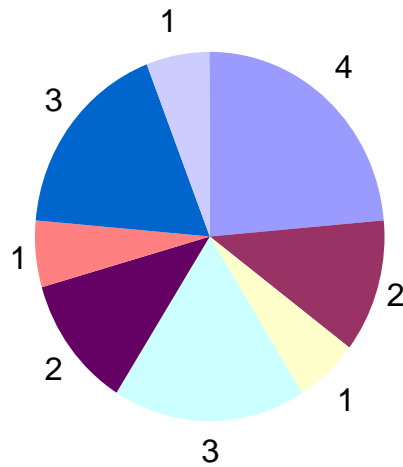
Coleta 2 – Segunda coleta; SEM PA – Sem *Pseudomonas aeruginosa*; PAM – *Pseudomonas aeruginosa* mucóide; PANM – *Pseudomonas aeruginosa* não-mucóide

Características do Grupo de Pacientes e das *Pseudomonas aeruginosa* Identificadas Geneticamente pelo Método RAPD

Das 138 cepas de *P. aeruginosa*, foram identificadas pelo método RAPD um total de 40 cepas relativas a 17 pacientes, em 35 pacientes não foi obtido o padrão de RAPD.

A faixa etária deste grupo de pacientes variou de 2 - 33 anos de idade, com média de 8,47 anos (dp = 7,9). A distribuição entre os gêneros foi 52,9% feminino e 47,1% masculino. No estudo genético, dos 17 pacientes, 52,9% eram homozigotos para $\Delta F508$, 23,5% para $\Delta F508 / -$, 5,9% para $G542X / -$, 5,9% heterozigoto para $\Delta F508 / N1303$ e em 11,8% paciente a mutação não foi identificada.

Das 40 cepas de *P. aeruginosa*, 20 eram de fenótipo mucóide e 20 não-mucóide, destas, 11/17 pacientes abrigavam cepas de *P. aeruginosa mucóide* e 13/17 pacientes cepas de *P. aeruginosa não-mucóide*. Dentre os pacientes, 4/17 apresentaram os dois fenótipos nas duas coletas; 2/17 apresentaram os dois fenótipos na primeira coleta e somente o fenótipo mucóide na segunda; 1/17 paciente na primeira coleta abrigou as duas cepas e na segunda somente a não-mucóide; 3/17 apresentaram *P. aeruginosa mucóide* nas duas coletas; 2/17 apresentaram *P. aeruginosa não-mucóide* nas duas coletas; 1/17 não apresentou nenhuma cepa de *P. aeruginosa* na primeira coleta, mas na segunda coleta apresentou cepas não-mucóide; 3/17 na primeira coleta apresentaram cepas não-mucóide e nenhuma cepa na segunda coleta; 1/17 apresentou cepa mucóide na primeira e nenhuma cepa na segunda coleta (figura 6).



- 2 Fenótipos nas 2 Coletas
- 1ª Coleta cepas mucóide+não-mucóide e 2ª Coleta cepa mucóide
- 1ª Coleta cepas mucóide+não-mucóide e 2ª Coleta cepa não-mucóide
- Cepas mucóides nas 2 Coletas
- Cepas não-mucóide nas 2 Coletas
- 1ª Coleta sem P.aeruginosa 2ª Coleta cepa não-mucóide
- 1ª Coleta cepa não-mucóide 2ª Coleta sem P.aeruginosa
- 1ª Coleta cepa mucóide 2ª Coleta sem P.aeruginosa

Figura 6- Fenótipos das 40 cepas da *P. aeruginosa* obtidas dos 17 pacientes.

Identificação Random Amplified Polymorphic DNA - RAPD

A tipagem pelo método RAPD foi realizada nas 40 cepas de *P. aeruginosa* obtida de 17 pacientes, foram identificados 14 padrões com o primer 208 (tabela 5) e 10 padrões com o primer 272 (tabela 6).

P. aeruginosa isolada do mesmo paciente apresentou o mesmo padrão na primeira e após seis meses na segunda coleta em 6/17 pacientes, independente do fenótipo da colônia; 4/17 apresentaram cepas de *P. aeruginosa* com genótipos distintos nas duas coletas (figura 7); 1/17 apresentou um genótipo na primeira e dois genótipos na segunda coleta; 1/17 apresentou cepas mucóide e não-mucóide nas duas coletas e foi observado que as cepas com mesmo fenótipo tinham o mesmo genótipo, porém mucóide e não-mucóide eram distintas geneticamente; 5/17 apresentaram cepas de *P. aeruginosa* em apenas uma coleta, impossibilitando a comparação após seis meses, dois destes são irmãos gêmeos e apresentaram cepas não-mucóide com mesmo padrão de RAPD (figura 8), os outros três apresentaram cepas distintas geneticamente dos demais pacientes. Exceto no caso dos irmãos gêmeos, não foi observado cepas com mesmo padrão de RAPD entre os pacientes em nenhum momento do estudo (figura 9, tabela 7).

Análise Comparativa dos Genótipos entre os 2 Momentos

A variabilidade genética da *P. aeruginosa* nos dois diferentes momentos de coleta foi confirmada pelo Teste de Wilcoxon para amostras não relacionadas, dos 17 pacientes, 12 foram avaliados, em 5 pacientes não foi possível aplicar o teste devido apresentarem cepas de *P. aeruginosa* em somente uma coleta. Houve significância estatística com $p = 0,020$.

A variabilidade fenotípica e genotípica das cepas de *P. aeruginosa* nos 17 pacientes que foram realizadas as reações de RAPD estão apresentadas na figura 10.

Tabela 5- Classificação das cepas de *P. aeruginosa* segundo RAPD (pb) – Primer 208.

PACIENTE	3	7	13	14	16	27	32	35	37	38	39
COLETA	1 ^a , 2 ^a	1 ^a	1 ^a	1 ^a	1 ^a	1 ^a	1 ^a	1 ^a	1 ^a	1 ^a	1 ^a
FENÓTIPO	Nm	M/Nm	M/Nm	Nm	Nm	M	M	M/Nm		Nm	Nm
	1767	2000	1884	2000	450	5000	925	1884		1884	1884
	1406	1650	1163	1767	400	1371	810	1325		1569	1569
	1243	1406	1000	1650	340	850	750	1163		1406	1405
	1000	1243	650	1406	300	500	710	650		1325	1325
	770	1000	425	1243	200	467	650	450		650	650
	450	850	325	1000	100	400	450			450	450
	350	690		850			340				
		500		650			200				
				450							
PADRÃO	1	3	4	6	7	8	10	11		14	14
COLETA	1 ^a , 2 ^a	2 ^a	2 ^a	2 ^a	2 ^a	2 ^a	2 ^a	2 ^a	2 ^a	2 ^a	2 ^a
FENÓTIPO	M	M/Nm	M/Nm	Nm		M		M	Nm		
	1650	2000	2000	2000		12000		1650	1000		
	1406	1650	1890	1767		1371		1487	730		
	1243	1406	1550	1650				925	425		
	1662	1243	1400	1406				784			
	1000	1000	1200	1243				925			
	850	850	1000	1000				784			
		690	500	850				600			
		500	480	650				450			
				450				400			
								320			
PADRÃO	2	3	5	6		9		12	13		

M – *Pseudomonas aeruginosa* mucóide

Nm – *Pseudomonas aeruginosa* não-mucóide

1^a - Primeira coleta

2^a - Segunda coleta

Tabela 6- Classificação das cepas de *P. aeruginosa* segundo RAPD (pb) – Primer 272.

PACIENTE	24		28	29	31	42	48
COLETA	1 ^a		1 ^a	1 ^a	1 ^a	1 ^a	1 ^a
FENÓTIPO	M/Nm		Nm	M	M/Nm	M	M/Nm
	950	850	2000	870	3750	1650	4450
	730	625	1650	625	3000	650	2500
	710	300	1630	475	2100		1650
		625	1500		2000		1325
		475	1000		1650		1000
			975		900		850
			850		850		750
			830		800		650
			810		650		540
			640		625		
					550		
PADRÃO	15	16	19	20	21	22	24
COLETA	2 ^a		2 ^a	2 ^a	2 ^a	2 ^a	2 ^a
FENÓTIPO	M/Nm		Nm	M	M	M	Nm
	3750	5000	2000	870	3750	3750	4450
	2000	1260	1650	625	3000	1650	2500
	1390	925	1630	475	2100	1435	1650
	1130	850	1500		2000	650	1325
		925	1000		1650	466	1000
		850	975		900		850
			850		850		750
			830		800		650
			810		650		540
			640		625		
					550		
PADRÃO	17	18	19	20	21	23	24

M – *Pseudomonas aeruginosa* mucóide Nm – *Pseudomonas aeruginosa* não-mucóide 1^a - Primeira coleta

2^a - Segunda coleta

208

272

M 8 8 9 9 0 20 20 20 20 0

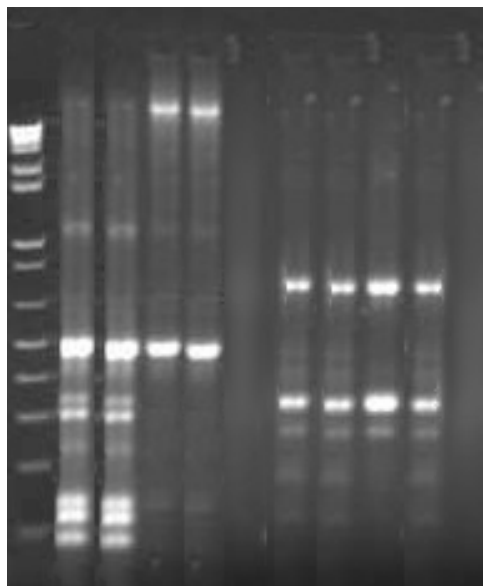


Figura 7- Perfil de RAPD da *Pseudomonas aeruginosa* – Primers 208 e 272.

Cepas de *P. aeruginosa* dos pacientes 27- primer 208 e 29- primer 272. Na linha M está o marcador de 1 kb plus, os tamanhos moleculares foram calculados em pb a partir do tamanho molecular indicado pelo marcador. Os padrões obtidos estão apresentados em duplicata, padrões 8 e 9 do paciente 27 e padrão 20 do paciente 29. Na linha 0 está a reação do branco. Observamos que o paciente 27 abrigou cepas distintas nos dois momentos de coleta, cepas 8 referente a primeira coleta e cepas 9 a segunda; enquanto o paciente 29 manteve-se com somente uma cepa de *P. aeruginosa* nos dois momentos de coleta.

208

208

M 14 14 0 14 14 0

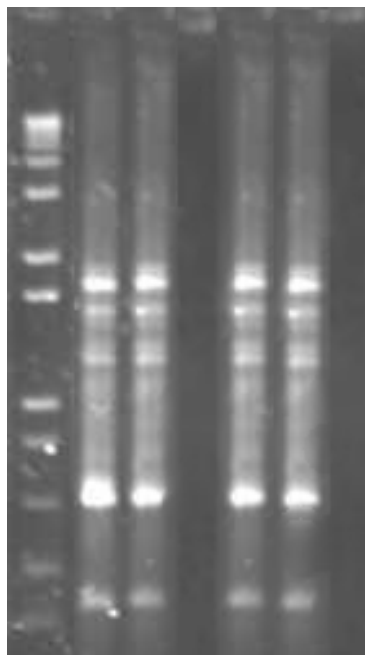


Figura 8- Perfil de RAPD da *P. aeruginosa* obtido de irmãos gêmeos.

Na primeira coluna está o marcador de 1 Kb plus. As cepas de *P. aeruginosa* são dos pacientes 38 e 39. Os padrões estão apresentados em duplicata, com a coluna 0 sendo a reação do branco. Observamos que as cepas de *P. aeruginosa* nestes pacientes apresentaram padrões de RAPD exatamente iguais, ambos pacientes com padrão 14, primer 208. Estes pacientes também apresentaram em comum, a presença da *P. aeruginosa* somente na primeira coleta.

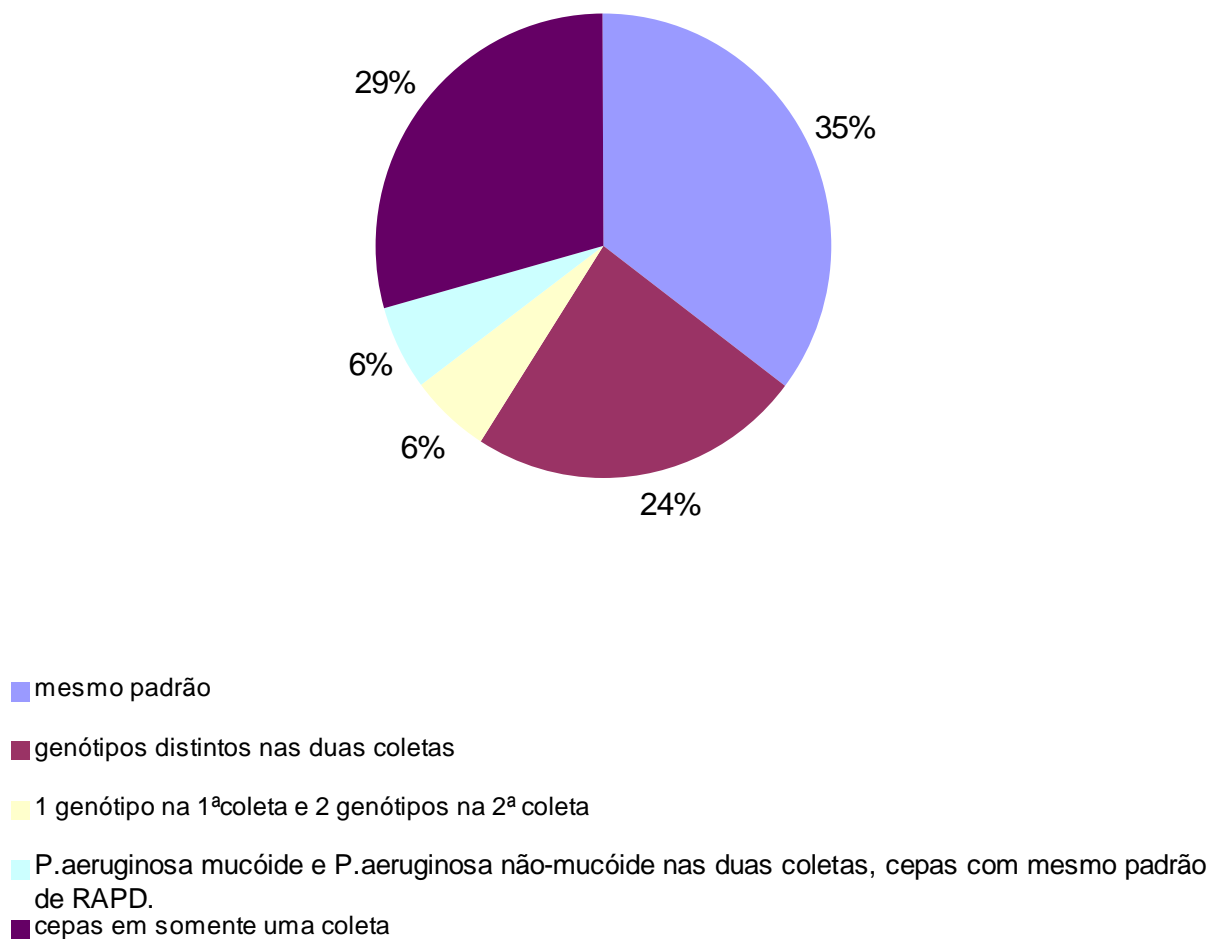


Figura 9- Distribuição dos padrões de RAPD das *Pseudomonas aeruginosa* nos 17 pacientes.

Tabela 7- Padrão de RAPD das *P. aeruginosa* isoladas dos 17 pacientes nos dois momentos da coleta.

Paciente (sexo)	RAPD 272	RAPD 208	Fen 1	Fen 2
3 (F)		1 / 2	M [¶] / Nm ^{**}	M / Nm
7 (M)		3	M / Nm	M / Nm
13 (M)		4 / 5	M / Nm	M / Nm
14 (F)		6	Nm	Nm
16 (F)		7	Nm	
24 (F)	15 / 16 / 17 / 18		M / Nm	M / Nm
27 (F)		8 / 9	M	M
28 (F)	19		Nm	Nm
29 (M)	20		M	M
31 (M)	21		M / Nm	M
32 (M)		10	M	
35 (M)		11 / 12	M / Nm	M
37 (F)		13		Nm
38 (M)		14	Nm	
39 (M)		14	Nm	
42 (F)	22 / 23		M	M
48 (F)	24		M / Nm	Nm
Total	10	14		

sexo: F – Feminino; M – Masculino.

RAPD 272 – Padrão de RAPD com o primer 272.

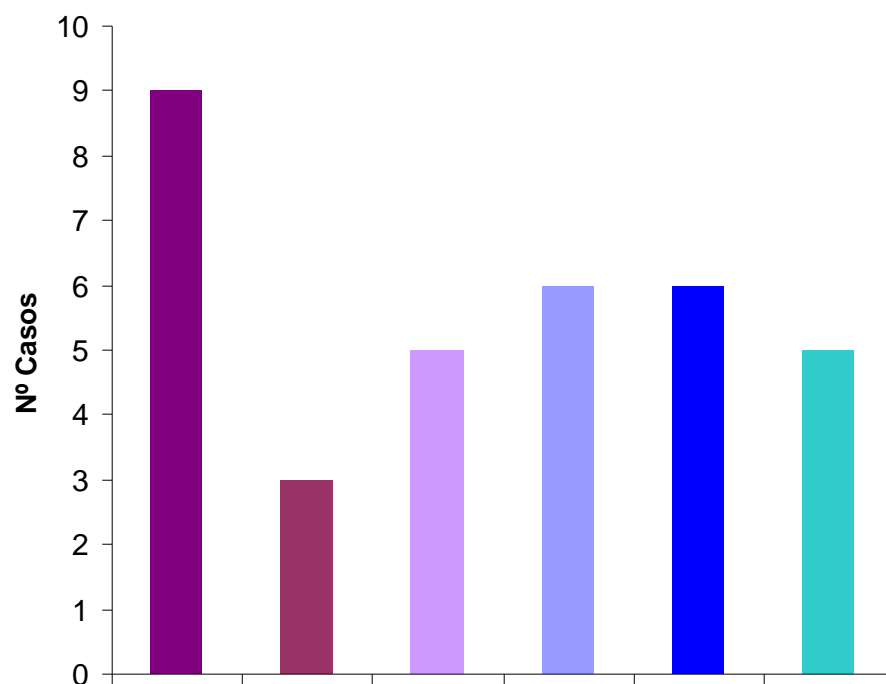
RAPD 208 – Padrão de RAPD com o primer 208.

Fen 1 – Fenótipo da *P. aeruginosa* na primeira coleta.

Fen 2 – Fenótipo da *P. aeruginosa* na segunda coleta.

M – *Pseudomonas aeruginosa* mucóide

Nm – *Pseudomonas aeruginosa* não-mucóide



- mesmo fenótipo nas duas coletas
- diferentes fenótipos nas duas coletas
- variabilidade fenotípica não determinada
- mesmo genótipo nas duas coletas
- diferentes genótipos nas duas coletas
- variabilidade genotípica não determinada

Figura 10- Variabilidade Fenotípica e Genotípica dos 17 pacientes.

DISCUSSÃO

O comportamento da *P. aeruginosa* na doença pulmonar em pacientes com FC permanece um assunto muito estudado na literatura. Diversos são os estudos sobre seu fenótipo, principalmente no que diz respeito ao fenótipo mucóide, a partir disto surgiram técnicas de biologia molecular para auxiliar a compreensão dos eventos que norteiam a infecção por esta bactéria, considerada atualmente o patógeno mais importante na infecção pulmonar crônica por conduzir a um quadro clínico grave, com piora do prognóstico após a sua aquisição com redução da sobrevida destes pacientes (Kosorok et al, 2001; Currie et al, 2003).

Neste estudo, investigamos a variabilidade genética e fenotípica da *P. aeruginosa*, por meio de técnicas microbiológicas para análise do fenótipo da sua colônia e por meio de técnicas de biologia molecular para determinar a característica genética. PFGE é método de escolha para estudos genéticos, porém é dispendioso e demorado (Mccallum et al., 2001; Silva et al., 2001). Mahenthiralingam et al (1996), em seu estudo sobre RAPD com *P.aeruginosa* em pacientes com FC, detectou entre cem primers de sequência arbitrária oito primers eficazes na identificação desta bactéria e utilizou os primers 272 e 208, quando comparado com PFGE, as cepas encontradas por ambos métodos apresentaram exata correlação, Campbell et al (2000), em estudo posterior concluiu que o RAPD é um método simples e altamente reproduzível e deve ser utilizado para esclarecer a epidemiologia da *P. aeruginosa* em pacientes com FC. Lanotte et al, 2004 sugeriram que o RAPD é um método válido para detecção genética entre as várias populações de *P. aeruginosa*. Verificamos que o RAPD é uma técnica fácil de ser utilizada na rotina de um laboratório de biologia molecular, auxiliando na detecção das cepas de *P. aeruginosa*.

Quanto ao fenótipo da *P. aeruginosa*, nossos dados mostram um equilíbrio entre cepas mucóides e não-mucóides. Seis pacientes mantiveram apenas um fenótipo no decorrer do estudo, quatro pacientes com cepas mucóide e dois com cepas não-mucóide. Verificamos também que 29,49 % dos pacientes apresentaram múltiplas cepas de *P. aeruginosa*, concordando com os achados dos estudos de Silbert et al., 2001 e Anthony et al., 2002. Magalhães et al, 2004 encontraram de 147 amostras obtidas de 36 pacientes, 96

com *P. aeruginosa*, 57 com fenótipo mucóide e 12 com ambos fenótipos, encontramos dos 138 isolados de 52 pacientes, 67 com fenótipo mucóide e 33 com ambos fenótipos.

Encontramos 18/52 pacientes da nossa amostra, com cultura negativa para *P. aeruginosa* em um momento das coletas, isto pode ser atribuído a uma redução na colonização dos pacientes pela antibioticoterapia, com conseqüente dificuldade em se obter as secreções das vias aéreas inferiores durante o processo de coleta, com diminuição na capacidade de identificação da bactéria. Segundo Silva et al., 2001 culturas negativas podem ser obtidas de pacientes com colonização intermitente ou mesmo crônica.

Na casuística estudada, a maior prevalência de *P. aeruginosa* foi observada no grupo entre 5 a 9 anos de idade, dado próximo ao da literatura, Silva et al, 2001 observaram prevalência da *P. aeruginosa* 5 a 10 anos, similar ao nosso achado. Magalhães et al, 2004 encontrou prevalência elevada da *P. aeruginosa* no grupo de 0-5 anos.

Na análise das mutações para FC, encontramos prevalência da *P. aeruginosa* nas mutações $\Delta F508/\Delta F508$ e $\Delta F508/-$, Maróstica et al, 1998 encontraram esta prevalência em sua casuística, com *P. aeruginosa* mais freqüente nos pacientes $\Delta F08/\Delta F508$.

O fenótipo e o genótipo da *P. aeruginosa* não apresentaram relação, observamos que as cepas com fenótipo mucóide ou não-mucóide podem ter padrões genéticos iguais ou diferentes, em um de dezessete pacientes verificamos a presença de cepas mucóides e não -mucóides nas duas coletas efetuadas. As cepas mucóides tinham o mesmo padrão de RAPD, bem como as não-mucóides, porém em outros pacientes este evento não foi observado, havendo cinco de dezessete casos que as cepas com mesmo fenótipo foram distintas geneticamente, por outro lado, observamos pacientes com cepas mucóides e não-mucóides iguais nos dois diferentes momentos de coleta. Em estudos genéticos realizados em *P. aeruginosa* isolada de pacientes com FC, demonstrou-se a heterogeneidade genética (Silva et al., 2001; Burns et al., 2000; Anthony et al., 2002), bem como o fato de que pacientes colonizados com cepas mucóides e não-mucóides, em termos genéticos, eram similares, confirmando que não há relação entre fenótipo e genótipo (Silva et al., 2001; Anthony et al., 2002).

Nossos resultados obtidos com RAPD dos isolados de *P. aeruginosa* concordaram com os resultados descritos por outros autores que por meio de técnicas de biologia molecular estudaram o genótipo da *P. aeruginosa*, tais estudos relatam a persistência de uma cepa em cada paciente do começo ao fim do estudo, apesar de alguns pacientes apresentarem mais de um genótipo durante o período do estudo (Silva et al., 2001). Encontramos cinco dos dezessete pacientes com dois genótipos e um com quatro diferentes genótipos. A persistência do clone das cepas da *P. aeruginosa* na flora de pacientes com FC é descrita por alguns autores (Mahenthalingam et al., 1996; Oliver et al., 2000). Os dados de Silbert et al., 2001 concluem que os pacientes com FC permanecem colonizados por mais de uma cepa de *P. aeruginosa* por longos períodos e a presença de diversas cepas com genótipos distintos no mesmo paciente sugere que a colonização pode ser restabelecida.

Encontramos dificuldade em alguns casos durante o processo de extração do DNA da *P. aeruginosa*, o que impossibilitou a tipagem pelo método em 35/52 pacientes. Silva et al., 2001 relataram em seu trabalho que as cepas de *P. aeruginosa* são particularmente difíceis de tipar, elas são normalmente deficientes em lipopolissacarídeos e as repostas a tipagem da piocina são devidas à conversão fenotípica.

Em nosso estudo, verificamos heterogeneidade, uma vez que detectamos 14 (54,16%) padrões diferentes com a utilização do primer 208 e 10 (62,5%) com o primer 272, independente do fenótipo da colônia, dado próximo ao de Silva et al. (2001), que encontrou padrões de RAPD distintos em 61,44% dos isolados. Anthony et al., 2002 encontraram por PFGE 21 padrões distintos em 50 isolados de *P. aeruginosa* obtidos de 18 pacientes com FC.

Burns et al., 2000 relataram que cada paciente foi infectado com um único genótipo de *P. aeruginosa*. Observamos que em 35,29% dos pacientes mantiveram-se com um único genótipo de *P. aeruginosa* nos dois momentos da coleta. Segundo Silbert et al., 2001 a permanência de um único genótipo nos pacientes sugere que mesmo durante períodos de antibioticoterapia, a cepa original não é erradicada da microbiota pulmonar.

Abman et al, 1991 em sua análise por “Southern blot” de uma série de isolados de *P. aeruginosa* indicaram que a mesma cepa persiste individualmente nos pacientes e era diferente entre os pacientes, sugerindo que apesar das eventuais mudanças fenotípicas da *P. aeruginosa* presente nos pulmões dos pacientes com FC, a cepa da colonização inicial persiste ao longo do tempo em muitos pacientes. Boukadida et al., 1993 em seu estudo encontraram cepas com genótipos distintos no mesmo paciente e observaram que a existência de cepas distintas no mesmo paciente foi muitas vezes associada com períodos de antibioticoterapia.

A aquisição da *P. aeruginosa* pelos pacientes com FC não é completamente compreendida, estudos tentam esclarecer o meio da contaminação. Speert et al, 2002 concluíram que o risco de aquisição da *P. aeruginosa* de outros pacientes é muito pequeno no centro de tratamento de FC em Vancouver. Abman et al, 1991 relataram que não houve aparente infecção cruzada entre os pacientes no centro de FC do Colorado. Al-Aloul et al, 2004 confirmaram a necessidade de segregação dos pacientes, devido à presença de cepas epidêmicas nos pacientes do centro de FC em Liverpool e sugere que a identificação em todos os centros é essencial e só pode ser efetuada por métodos de tipagem genômica.

Similarmente a outros estudos, nossos resultados sugerem que a infecção cruzada por *P. aeruginosa* entre pacientes com FC ocorre mais freqüentemente quando há contato mais intenso, o risco de adquirir *P. aeruginosa* de outro paciente é pequeno, uma vez que apenas pacientes irmãos gêmeos possuíam a mesma cepa de *P.aeruginosa*. (Silbert et al, 2001; Speert et al, 2002).

CONCLUSÕES

Na casuística estudada encontramos:

1. Uma distribuição homogênea das cepas *P.aeruginosa* mucóide e não –mucóide;
2. Ausência de relação entre o genótipo e o fenótipo da *P. aeruginosa*;
3. Heterogeneidade fenotípica e genotípica da *P. aeruginosa*, entre os pacientes fibrocísticos e na evolução de um mesmo paciente;
4. Evidências de não aquisição da *P. aeruginosa* pelos pacientes no ambiente do nosso centro de atendimento;
5. Um único caso de infecção cruzada (gemelares), favorecendo a hipótese de aquisição da *P. aeruginosa* pelos pacientes, quando há um contato intenso e prolongado entre estes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abman SH, Ogle JW, Harbeck RJ, Butler-Simon N, Hammond KB, Accurso FJ. Early bacteriologic, immunologic, and clinical courses of young infants with cystic fibrosis identified by neonatal screening. *The Journal of Pediatrics*. 1991; 119 (2): 211-17.

Al-Aloul M, Crawley J, Winstanley C, Hart CA, Ledson MJ, Walshaw MJ. Increased morbidity with chronic infection by an epidemic *Pseudomonas aeruginosa* strain in CF patients. *Thorax*. 2004; 59:334-336.

Anthony MA, Rose B, Pegler MB, Elkins M, Service H, Thamotharampillai K, et al. Genetic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the sputa of Australian adult cystic fibrosis patients. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002; Aug: 2772-8.

Alvarez AE, Ribeiro JD, Ribeiro AF, et al. Fibrose Cística em um centro de referência no Brasil: características clínicas e laboratoriais de 104 pacientes e sua associação com o genótipo e a gravidade da doença. *J Pediatr* 2004; v. 5, 80: 371-79, 2004.

Armstrong DS, Nixon GM, Carzino R, Bigham A, Carlin JB, Robins-Browne, Grimwood K. Detection of widespread clone of *Pseudomonas aeruginosa* in a pediatric cystic fibrosis clinic. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002; 166: 983-987.

Boucher RC. New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Eur Respir J*, 2004; 23: 146-58.

Boukadida J, De Montalembert M, Lenoir G, Scheinmann P, Veron M, Berche P. Molecular epidemiology of cronic pulmonary colonization by *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *J Med Microbiol*. 1993; 38: 29-33.

Brennan A L, Geddes, DM. Cystic fibrosis. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 2002; 15:175-82.

Burns JL, Gibson RL, Mcnamara S, Yim D, Emerson J, Roseneld M, et al. Longitudinal assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in young children with cystic fibrosis. *The Journal of infectious Diseases*. 2001; 183: 444-52.

Campbell M, Mahenthiralingam E, Speert DP. Evaluation of random amplified polymorphic DNA. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000; 38 (12): 4614-15.

- Currie AJ, Speert DP, Davidson DJ. *Pseudomonas aeruginosa*: role in the pathogenesis of the lung lesion. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*. 2003; 24 (6): 671-680.
- Davies JC. *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic fibrosis: pathogenesis and persistence. *Paediatric Respiratory Reviews*. 2002; 3:128-34.
- De Araújo M, Sanches MR, Suzuki LA, Guerra Jr. G, Farah SB, De Mello MP. Molecular analysis of CYP21 and C4 genes in Brazilian families with the classical form of steroid 21-hydroxylase deficiency. *Braz J Med Biol Res* 1996; 29: 1-13.
- Doring G, Conway SP, Heijeman HGM, Hodson ME, Hoiby N, Smith A, et al. Antibiotic therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: a European consensus. *Eur Respir J*. 2000; 16:749-67.
- Finnan S, Morrissey JP, O' Gara F, Boyd EF. Genome diversity of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients and the hospital environment. *Journal of Microbiology*. 2004; Dez: 5783-92.
- Freeman WH, http://paginas.terra.com.br/educacao/biolmol/GeneticaMedicina/Base_molecular_das_doencas.htm.
- Gracia J, Mata F, Álvarez A, Casals T, Gatner S, Vendrell M, et al. Genotype-phenotype correlation for pulmonary function in cystic fibrosis. *Thorax*. 2005; 60: 558-563.
- Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. Pathophysiology and management of Pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003; 168; 918-51.
- Gilligan PH. Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis. *Clinical microbiology reviews*. 1991; 4 (1): 35-51.
- Head NA, Yu H. Cross-sectional analysis of clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: biofilm formation, virulence, and genome diversity. *Infection and immunity*. 2004; 72 (1): 133-144.
- Jones AM, Govan JRW, Doherty CJ, Dodd ME, Isalska BJ, Stanbridge TN, Webb AK. Spread of a multiresistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* in an adult cystic fibrosis clinic. *The lancet*. 2001; 358: 557-58.

- Jung A, Kleinau I, Schonian A, Chen C, Griesse M, et al. Sequential genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* from upper and lower airways of cystic fibrosis. *Eur respir J*. 2002; 20: 1457-63.
- Kiska DL, Gilligan PH. *Pseudomonas* In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington: ASM Press; 2003. 8 ed, 1: 719- 28.
- Kerem E, Corey M, Gold R, Levison H. Pulmonary function and clinical course in patients with cystic fibrosis after pulmonary colonization with *Pseudomonas aeruginosa*. *The journal of Pediatrics*. 1990; 116 (5): 714-19.
- Koch C, Cuppens H, Rainisio M, Madessani U, Harms HK, Hodson ME, et al. European epidemiologic registry of cystic fibrosis (ERCF): Comparison of major disease manifestations between patients with different classes of mutations. *Pediatric Pulmonology*. 2001; 31: 1-12.
- Kosorok MR, Zeng L, West SEH, Rock MJ, Splaingard ML, Laxova A, et al. Acceleration of lung disease in children with cystic fibrosis after *Pseudomonas aeruginosa* acquisition. *Pediatric Pulmonology*; 2001 32: 277-287.
- Lanotte P, Watt S, Mereghetti L, Dartighelongue N, Rastegar-lari, A, Goudeau A, et al. Genetic features of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients compared with those of isolates from other origins. *Journal of Medical Microbiology*. 2004; 53: 73-81.
- Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 2002; 15 (2): 194-222.
- Magalhães M, Britto MCA, Bezerra PGM, Veras A. Prevalência de bactérias potencialmente patogênicas em espécimes respiratórias de fibrocísticos do Recife. *J Bras Patol Med Lab*. 2004; 40 (4): 223-227.
- Mahenthiralingam E, Campbell ME, Foster J, Lam JS, Speert DP. Random Amplified Polymorphic DNA typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from patients with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 1996; May: 1129-35.

Maróstica PJC, Raskin S, Abreu-e-Silva FA. Analysis of the $\Delta F508$ mutation in a Brazilian cystic fibrosis population: comparison of pulmonary status of homozygotes with other patients. *Braz J of Med Biol Res*; 1998 31 (4): 529-532.

Mccallum SJ, Corkill J, Gallagher M, Ledson MJ, Hart CA, Wlshaw MJ. Superinfection with a transmissible strain of *Pseudomonas aeruginosa* in adults with cystic fibrosis chronically colonized by *P aeruginosa*. *Lancet*. 2001; 358: 558-60.

Moore JE, Shaw A, Howard JL, Dooley JSG, Elborn JS. Infection control and the significance of sputum and other respiratory secretions from adult patients with cystic fibrosis. *Ann of Clin Microbiol*. 2004; 3 (1): 8.

Oliver A, Rafael C, Pilar C, Fernando B, Jesus B. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic fibrosis lung infection. *Science*. 2000; 288: 1251-53.

Ortiz-Herrera M, Geronimo-Gallegos A, Cuevas-Schacht F, Pérez-Fernandes L, Coria-Jimenez R. Caracterización, por RAPD-PCR, de aislados de *Pseudomonas aeruginosa* obtenidos de pacientes con fibrosis quística. *Salud Publica de México*. 2004; 46: 149-57.

Ratjen F, Doring G. Cystic Fibrosis. *Lancet*. 2003; 361: 681-89.

Reis FJC, Damaceno N. Fibrose cística. *J Pediatr (Rio J)* 1998; 74 (supl 1): S76- S94.
Ribeiro DC, Ribeiro MAG O, Ribeiro, AF. Controvérsias na fibrose cística – do pediatra ao especialista. *Jornal de Pediatria*. 2002; 78(Supl. 2): S171-S186.

Rowe SM, Miller MD, Sorscher EJ. Cystic fibrosis. *The New England Journal of Medicine*. 2005; 352:1992-2001.

Saiman L, Siegel J. Infection control in cystic fibrosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 2004; Jan.57-71.

Speert DP, Campbell M E, Henry DA, Milner R, Taha F, Gravelle A, et al. Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis in British Columbia, Canada. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002; 166: 988-93.

Spencer DH, Kas A, Smith, E E, Raymond CK, Sims E H, Hastings CK. Whole-genome sequence variation among multiple isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*. 2003; Feb: 1316-25.

Silbert S, Barth AL, Sader HS. Heterogeneity of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001; Nov: 3976-81.

Silva Filho LVF, Levi JE, Bento CNO, Rodrigues JC, Ramos SRTS. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* infections in a cystic fibrosis outpatient clinic. *Journal of Medical Microbiology*. 2001; 50 (3): 261-7.

Vandame PAR. Taxonomy and Classification of Bacteria. In: Murray PR, et al. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington: ASM Press; 2003. 8 ed, 1: 271-285.

Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. DNA polymorphisms amplified by primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 1990; 18 (22): 6531-535.

Wolfgang MC, Jyot J, Goodman AL, Ramphal R, Lory S. *Pseudomonas aeruginosa* regulates flagellin expression as part of a global response to airway fluid from cystic fibrosis patients. *Microbiology*. 2004; April: 101(17): 6664-8.

ANEXO

ANEXO 1



**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

✉ Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP

☎ (0_19) 3788-8936

FAX (0_19) 3788-8925

🌐 www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

✉ cep@fcm.unicamp.br

CEP, 19/10/04.

(PARECER PROJETO 376/2000)

PARECER

I-IDENTIFICAÇÃO:

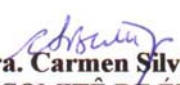
PROJETO: “AVALIAÇÃO DA SIGNIFICÂNCIA CLÍNICA DO *ASPERGILLUS FUMIGATUS* NAS SECREÇÕES RESPIRATÓRIAS DE CRIANÇAS COM FIBROSE CÍSTICA”

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Leo Roberto Barth.

II - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP aprovou a inclusão da análise dos microorganismos *Pseudomonas aeruginosa*, *B. cepacia*, *S. aureus*, *H. influenzae*, *S. maltophilia* e *A. xylosoxidans* e a inclusão do projeto “**ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÓTIPO-FENÓTIPO DA *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* EM PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA**”, sobre responsabilidade da aluna Isabella Chiarini Mathiazzi, ao protocolo de pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.


Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

APÊNDICE

APÊNDICE 1

Ficha para Coleta de Dados

Identificação

Nome: _____ N° HC: _____

Data da nascimento: _____ Sexo: _____

Mutação FC: _____

Teste do suor: 1ª dosagem Na⁺ _____ CL⁻ _____

2ª dosagem Na⁺ _____ CL⁻ _____

Coleta do Material

Data ____/____/____ Material _____

PANM _____ N° cepa _____

PAM _____ N° cepa _____

Outros microrganismos _____

Antibiograma _____

Coleta do Material

Data ____/____/____ Material _____

PANM _____ N° cepa _____

PAM _____ N° cepa _____

Outros microrganismos _____

Antibiograma _____

